

引用:李志军,景伟超,王钊杰,李桃丹,常钰昕,王有鹏.苍耳温胆汤对变应性鼻炎大鼠TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响[J].中医导报,2025,31(6):36-41.

苍耳温胆汤对变应性鼻炎大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响*

李志军¹,景伟超¹,王钊杰¹,李桃丹²,常钰昕²,王有鹏¹

(1.黑龙江中医药大学附属第二医院,黑龙江 哈尔滨 150001;

2.黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150006)

[摘要] 目的:探讨苍耳温胆汤对变应性鼻炎(AR)大鼠TOLL样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路的影响。方法:将40只雄性大鼠随机分为空白组、模型组、西替利嗪组和苍耳温胆汤组,每组10只。除空白组外,其余3组大鼠采用含有卵蛋白(OVA)及氢氧化铝[Al(OH)₃]的致敏液致敏,建立过敏性鼻炎大鼠模型。各组予相应药物干预7 d。观察记录大鼠鼻炎症状测定评分;采用苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠鼻黏膜组织学形态变化;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清免疫球蛋白E(IgE)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)水平;采用蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测鼻黏膜TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达;采用逆转录实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测鼻黏膜TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF- κ B mRNA表达。结果:给药后,模型组大鼠鼻炎症状测定评分高于空白组($P<0.05$);苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻炎症状测定评分均低于模型组($P<0.05$);苍耳温胆汤组大鼠鼻炎症状测定评分与西替利嗪组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HE染色显示,空白组大鼠鼻黏膜组织形态结构完整,形态正常;模型组大鼠鼻黏膜大量炎症细胞浸润,且细胞排列紊乱;苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻黏膜组织中炎症细胞浸润程度及细胞排列紊乱程度均低于模型组。模型组大鼠血清IgE、IL-6水平高于空白组($P<0.05$),IL-10水平低于空白组($P<0.05$);苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠血清IgE、IL-6水平均低于模型组($P<0.05$),IL-10水平均高于模型组($P<0.05$);苍耳温胆汤组大鼠血清IgE、IL-6水平低于西替利嗪组($P<0.05$),IL-10水平高于西替利嗪组($P<0.05$)。模型组大鼠鼻黏膜TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白相对表达量及TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF- κ B mRNA相对表达量均高于空白组($P<0.05$);苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻黏膜TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白相对表达量及TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF- κ B mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.05$);苍耳温胆汤组大鼠鼻黏膜TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白相对表达量及TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF- κ B mRNA相对表达量均低于西替利嗪组($P<0.05$)。结论:苍耳温胆汤能改善AR大鼠症状及炎症反应,其作用机制可能与调控TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路有关。

[关键词] 变应性鼻炎;苍耳温胆汤;分消走泄法;TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)06-0036-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.007

The Effect of Cang'er Wendan Tang (苍耳温胆汤) on TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway in Rats with Allergic Rhinitis

LI Zhijun¹, JING Weichao¹, WANG Yijie¹, LI Taodan², HANG Yuxin², WANG Youpeng¹

(1.Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang 150001, China; 2.Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang 150006, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Cang'er Wendan Tang (CEWDT) on the TOLL-like receptor4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) pathway in allergic rhinitis (AR) rats. Methods: Totall 40 male rats were randomly divided into blank group, model group,

*基金项目:黑龙江省中医药管理局国医大师学术思想传承(GY2022-24);国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验传承工作项目(国中医药人教函[2022]76号)

通信作者:王有鹏,男,教授,主任医师,研究方向为中医药治疗儿童常见疾病

cetirizine group and CEWDT group, with 10 rats in each group. Except for the blank group, the rats in the other three groups were sensitised with sensitising solution containing ovalbumin (OVA) and Al (OH)₃ to establish an allergic rhinitis rat model. Each group was given corresponding medication intervention for 7 days. The rats' rhinitis symptom scores were observed and recorded. Histological and morphological changes in the nasal mucosa of rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum IgE, interleukin-6 (IL-6) and IL-10 levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Nasal mucosal TLR4, MyD88 and NF- κ B protein expression levels were detected by protein Western blotting, and TLR4 mRNA, MyD88 mRNA and NF- κ B mRNA expression levels were detected by RT-qPCR. Results: After administration, the rats in the model group showed higher rhinitis symptom scores than those in the blank group ($P<0.05$). The rats in the CEWDT group and the cetirizine group showed lower rhinitis symptom scores than those in the model group ($P<0.05$). The difference in rhinitis symptom scores between CEWDT group and cetirizine group was not statistical ($P>0.05$). HE staining showed that the nasal mucosa tissue of rats in the blank group was structurally intact and normal. The nasal mucosa of rats in the model group was infiltrated by a large number of symptomatic cells and the arrangement of cells was disorganized. The degree of inflammatory cell infiltration and disorganization of cells in the nasal mucosa tissue of rats in the CEWDT group and the cetirizine group was lower than that of the model group. The model group showed higher serum IgE and IL-6 levels than blank group ($P<0.05$), while lower expression level of IL-10 than blank group ($P<0.05$). The CEWDT group and cetirizine group showed lower serum IgE and IL-6 levels than model group ($P<0.05$), while higher level of IL-10 than model group ($P<0.05$). The CEWDT group showed lower serum IgE and IL-6 levels than cetirizine group ($P<0.05$), while higher serum IL-10 level than cetirizine group ($P<0.05$). The model group showed higher relative expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B proteins and relative expression of TLR4 mRNA, MyD88 mRNA and NF- κ B mRNA than blank group ($P<0.05$). The CEWDT group and cetirizine group showed lower relative expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B proteins and relative expression of TLR4 mRNA, MyD88 mRNA and NF- κ B mRNA than model group ($P<0.05$). The CEWDT group showed lower relative expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B proteins and relative expression of TLR4 mRNA, MyD88 mRNA and NF- κ B mRNA than cetirizine group ($P<0.05$). Conclusion: Cang'er Wendan Tang can improve clinical symptoms and inflammatory responses in AR rats, and its mechanism of action may be related to regulatory of TLR4/MyD88/NF- κ B signalling pathway.

[Keywords] allergic rhinitis; Cang'er Wendan Tang; dispersing and discharging method; TOLL-like receptor4/myeloid differentiation factor 88/nuclear transcription factor- κ B pathway; rat

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是一种常见的慢性炎症性鼻病,其中儿童AR是儿童最常见的变态反应性疾病之一。近20年我国儿童AR总体患病率达18.46%,且呈逐年上升的趋势^[1]。临床表现以鼻痒、喷嚏、鼻塞和流涕等症状为主,严重者伴发阻塞性睡眠呼吸障碍、支气管哮喘及腺样体肥大等疾病,若病情迁延不愈,则影响患儿及家属的生活质量^[2]。现阶段西医治疗AR的方案主要为口服鼻用抗组胺药物、白三烯受体拮抗剂、糖皮质激素类药物以及手术治疗^[3]。部分药物能迅速起效缓解过敏症状,但存在长期服药副作用大,停药后易复发,部分患儿依从性差,以及远期疗效欠佳等缺点^[4]。AR发病机制涉及多种免疫细胞和分子,其中Toll样受体4(TOLL-like receptor4, TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核转录因子- κ B/(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路在调节炎症反应中发挥重要作用^[5]。近年来中医治疗AR手段丰富,能缓解疾病症状,控制病情发展,降低复发率,取得了较为满意的疗效,显示出良好的发展前景^[6-7]。

王有鹏教授基于深厚的临床积淀,汲取张仲景“合方理论”之精髓,遵循国医大师张琪“合方治病”的学术思想,并结合寒地儿童独特的生理病理特点,应用“分消走泄法”拟定了苍耳温胆汤^[8]。经多年临床实践验证,该方治疗儿童AR疗效显著^[9]。本研究拟探讨苍耳温胆汤对AR大鼠鼻黏膜TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的调控作用,进而阐明其治疗AR的机制。

1 材料

1.1 实验动物 SD大鼠,雄性,SPF级,6~8周龄,体质量(250.36 \pm 50.24)g,购自黑龙江中医药大学药物安全性评价中心,动物生产许可证号:SCXK(黑)2023-001。动物质量合格证号:11400700366984。大鼠适应性饲养7 d,饲养条件:日光照明,喂食不含致敏原的特殊饲料,温度为(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为(50 \pm 10)%,12 h/12 h明暗交替。本研究遵循《实验动物管理条例》,并经黑龙江中医药大学伦理委员会批准(伦理批号:2023122925)。

1.2 药物 苍耳温胆汤组成:茯苓10 g,苍耳子、清半夏、姜竹茹、白芷、陈皮、麸炒枳实、薄荷各6 g,辛夷、生甘草各3 g。获

芩(批号:Y00066)、苍耳子(批号:Y00024)、清半夏(批号:Y00167)、姜竹茹(批号:Y00239)、白芷(批号:Y00013)、陈皮(批号:Y00034)、麸炒枳实(批号:Y00240)、薄荷(批号:Y00022)、辛夷(批号:Y00210)、生甘草(批号:Y00072)均购自黑龙江省药材公司,经黑龙江中医药大学附属第二医院主管药师李南鉴定,均为正品。中药饮片经过浸泡、煎煮、过滤、浓缩成药液。药液封装在消毒容器中,经过滤后,4℃保存备用。盐酸左西替利嗪片(湖南九典制药股份有限公司,批号:4230705)。

1.3 主要试剂 卵蛋白(OVA)(美国sigma公司,批号:9006-59-1);氢氧化铝凝胶(上海阿拉丁生化科技有限公司,批号:21645-51-2);HE染色试剂盒(安徽白鲨生物科技有限公司,批号:BL700B);BCA蛋白测定试剂盒(安徽白鲨生物科技有限公司,批号:BL521A);荧光定量PCR试剂盒(安徽白鲨生物科技有限公司,批号:BL698A);山羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZB-2301);ELC发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号:PE0010);SDS-PAGE凝胶试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1200);裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0013);Trizol总RNA提取试剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号:R0016);反转录试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:D7168M);免疫球蛋白E(IgE)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号:H107-1-1);白介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号:H007-1-1);白介素-10(IL-10)ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号:H009-1-2);TLR4抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:19811-1-AP9);MyD88抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:23230-1-AP);NF-κB抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:10745-1-AP);GAPDH抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:10494-1-AP)。

1.4 主要仪器 -80℃超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司,型号:DW HL-668);低温高速离心机(美国Sigma公司,型号:3K30);水平摇床(北京六一生物有限公司,型号:WD-9405B);大型超净工作台(苏州净化设备厂,型号:YZ-875);电子分析天平(北京塞多利斯仪器有限公司,型号:BSA124S);紫外分光光度计(美国Thermo公司,型号:840-317400);微量移液器(德国艾本德股份公司,型号:Eppendorf);酶标分析仪(美国伯腾仪器有限公司,型号:ELX-800);石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);台式离心机(上海安亭科学仪器厂,型号:TGL-16G);超纯水系统(德国默克公司,型号:Millipore-Q advantage A10);实时定量PCR仪(美国BIO-RAD公司,型号:S100);万用显微镜(日本奥林巴斯,型号:A.H-B-L);蛋白转印装置转电泳槽及凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:170-4150)。

2 方 法

2.1 分组与造模 将40只SD大鼠随机分为空白组、模型组、西替利嗪组、苍耳温胆汤组。参照文献中方案^[10-11]制备AR大鼠

模型。采用含OVA(0.3 mg)、Al(OH)₃(30.0 mg)的0.9%NaCl液(1 mL)制作致敏剂。模型组、西替利嗪组、苍耳温胆汤组大鼠腹腔注射1 mL致敏剂,空白组腹腔注射1 mL 0.9%NaCl溶液,连续14 d,隔日1次,连续注射7次。从第15天起,模型组、西替利嗪组、苍耳温胆汤组大鼠予5%OVA 10 μL滴入双侧鼻腔局部激发,空白组大鼠予等量的0.9% NaCl溶液滴入双侧鼻腔,1次/d,连续7 d。

最后一次滴鼻后10 min记录大鼠挠鼻程度、喷嚏次数及流涕范围,计算鼻炎症状测定评分^[10]。评分标准见表1。鼻炎症状测定评分大于5分,说明造模成功。

表 1 鼻炎症状测定评分标准

行为	1分	2分	3分
挠鼻程度	轻度鼻痒(轻擦鼻1-3次)	中度鼻痒(挠鼻频繁)	重度鼻痒(双前肢挠鼻不停)
喷嚏次数	1-3	4-10	≥11
流涕范围	流至前鼻孔	超过前鼻孔	流涕满面

2.2 给药 参考动物与人体间等效剂量换算^[12],苍耳温胆汤组大鼠予苍耳温胆汤灌胃[4.86 g/(kg·d)],西替利嗪组大鼠予盐酸左西替利嗪片溶液灌胃[1.25 mg/(kg·d)],空白组、模型组予等体积0.9%NaCl溶液灌胃,1次/d,连续7 d。

2.3 取材 于末次给药后,大鼠过夜禁食但不限水,腹腔注射2%戊巴比妥[30 mg/(kg·d)]进行麻醉,取仰卧位固定,用2 mL非抗凝采血管行腹主动脉取血,4℃,4 000 r/min(离心半径为10 cm)离心15 min,取得上清液,即得血清,分装后放入-80℃超低温冰箱保存。取完血清后,采用颈椎脱臼法处死大鼠后,剥离双侧鼻中隔黏膜,将每组大鼠鼻组织样本分成两部分。一部分固定在4%多聚甲醛(pH=7.4)溶液中,并放置4℃冰箱内固定24 h,固定结束后置于10%蔗糖溶液中至沉底,最后置于10%EDTA溶液中浸泡10 d。脱钙完成后,石蜡包埋固定,5 μm厚度切片后等处理。另一部分保存在-80℃条件下进行后续实验。

2.4 观察指标

2.4.1 鼻黏膜病理变化 采用HE染色观察大鼠鼻黏膜病理变化,将制备好的切片用二甲苯脱蜡、乙醇水化,苏木精、伊红染色,梯度酒精脱水,封片剂封片。光镜下观察大鼠鼻黏膜组织病理学改变。

2.4.2 血清IgE、IL-6、IL-10水平 采用ELISA法检测大鼠血清IgE、IL-6、IL-10水平,遵循试剂盒说明书进行检测。

2.4.3 大鼠鼻黏膜TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF-κB mRNA表达水平 采用RT-qPCR法检测大鼠鼻黏膜TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF-κB mRNA表达水平。取出各组大鼠鼻黏膜组织,充分研磨后用Trizol法提取总RNA,使用紫外分光光度计测定各组RNA的浓度,根据提取的RNA样本浓度加入RNA样本,保证RNA上样浓度一致,对RNA样本进行逆转录以获取cDNA,-20℃低温存放。根据基因序列设计检测引物,以GAPDH为内参,以制备好的cDNA作为模板链进行聚合酶链反应,完成后计算数据2^{-ΔΔCt}值,检测各指标mRNA的表达。引物序列信息见表2。

表2 引物序列

目的基因	引物序列	扩增产物片段长度/bp
TLR4	上游引物:3'CCTGATGAGTGCCAACTT 5' 下游引物:3'ACTGTAAGAGATGTCAAGGT 5'	126
NF- κ B	上游引物:3'CGACACCTCTACATAGC 5' 下游引物:3'TCATCTTCTCCAGCCTTCT 5'	142
MyD88	上游引物:3'TGTTAGACCGTGAGGATATAC 5' 下游引物:3'GGCAGTAGCAGATGAAGG 5'	222
GAPDH	上游引物:3'TTCAACGGCAGCTCAAG 5' 下游引物:3'TACTCAGCACCAGCATCA 5'	116

2.4.4 大鼠鼻黏膜组织TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达水平 采用Western blotting法检测大鼠鼻黏膜组织TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白表达水平。将各组大鼠鼻黏膜组织在蛋白裂解液中匀浆,冰上裂解30 min,4℃ 12 000 r/min(离心半径为10 cm)离心15 min,取上清液并使用BCA蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样本通过10%SDS-PAGE上样缓冲液稀释并分离,以半干转移系统凝胶转膜,15 V恒电压转膜20 min,转移到PVDF膜上,用TBST溶液快速涮洗1次,然后加上5%脱脂牛奶,室温下在水平摇床上封闭2 h,一抗稀释后,将膜与配置好的TLR4、MyD88、NF- κ B的特异性一抗4℃孵育过夜。用TBST溶液清洗3次,二抗以1:10 000的比例进行稀释,室温下孵育1 h,再次用TBST溶液清洗4次,使用ECL发光试剂显现免疫反应性蛋白条带,利用图像分析软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参的比值表示目的蛋白相对表达量。

2.5 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计分析,使用GraphPad Prism 8作图。计量资料符合正态分布且方差齐,以“均数 \pm 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示。多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠鼻炎症状测定评分比较 给药前,除空白组外,其余3组大鼠鼻炎症状测定评分均大于5分,提示造模成功。给药后,模型组大鼠鼻炎症状测定评分高于空白组($P<0.05$);苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻炎症状测定评分均低于模型组($P<0.05$);苍耳温胆汤组大鼠鼻炎症状测定评分与西替利嗪组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表3)

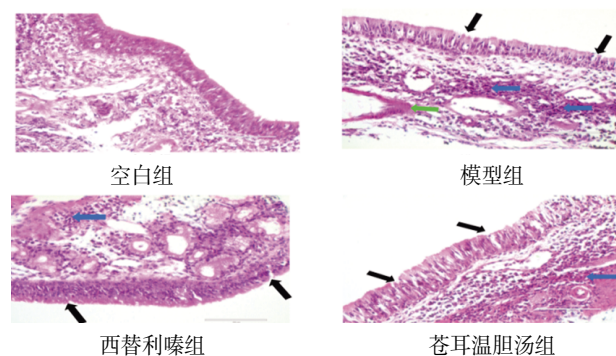
表3 各组大鼠鼻炎症状测定评分比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	给药前	给药后
空白组	10	0.10 \pm 0.32	0.20 \pm 0.42
模型组	10	7.00 \pm 1.05 ^a	7.40 \pm 1.07 ^a
西替利嗪组	10	6.90 \pm 0.99 ^a	2.10 \pm 0.74 ^{ab}
苍耳温胆汤组	10	6.90 \pm 1.29 ^a	2.20 \pm 0.79 ^{abc}
F		121.133	152.787
P		0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与西替利嗪组比较,^c $P>0.05$ 。

3.2 鼻黏膜病理变化 空白组大鼠鼻黏膜组织形态结构完整,形态正常;模型组大鼠鼻黏膜可见异常的形态结构,上皮

结构不完整,部分脱落,有不同程度的组织水肿及毛细血管扩张,大量炎症细胞浸润;苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻黏膜上皮细胞结构较完整,血管扩张相对降低,炎症细胞浸润较少,鼻黏膜损伤显著减轻。(见图1)



注:黑色箭头表示脱落的上皮细胞,绿色箭头为坏死的上皮细胞,蓝色箭头为浸润的中性粒细胞。

图1 各组大鼠鼻黏膜病理变化 (HE, $\times 400$)

3.3 各组大鼠血清IgE、IL-6及IL-10水平比较 模型组、苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠血清IgE及IL-6水平均高于空白组($P<0.05$),IL-10水平均低于空白组($P<0.05$);西替利嗪组及苍耳温胆汤组大鼠血清IgE及IL-6水平均低于模型组($P<0.05$),IL-10水平均高于模型组($P<0.05$),表明两种药物均可以降低血清IgE及促炎因子IL-6水平;苍耳温胆汤组大鼠血清IgE及IL-6水平低于西替利嗪组($P<0.05$),IL-10水平高于西替利嗪组($P<0.05$)。(见表4)

表4 各组大鼠血清IgE、IL-6及IL-10水平比较 ($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	n	IgE	IL-6	IL-10
空白组	10	30.14 \pm 2.59	141.37 \pm 46.24	196.42 \pm 13.93
模型组	10	76.64 \pm 8.59 ^a	280.78 \pm 117.31 ^a	60.56 \pm 5.59 ^a
西替利嗪组	10	45.55 \pm 13.08 ^{ab}	169.03 \pm 22.49 ^{ab}	108.53 \pm 8.94 ^{ab}
苍耳温胆汤组	10	34.27 \pm 2.79 ^{abc}	88.10 \pm 6.77 ^{abc}	182.59 \pm 16.03 ^{abc}
F		23.663	18.826	49.782
P		0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与西替利嗪组比较,^c $P<0.05$ 。

3.4 各组大鼠鼻黏膜TLR4 mRNA、MyD88 mRNA及NF- κ B mRNA相对表达量比较 模型组、苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻黏膜TLR4 mRNA、MyD88 mRNA及NF- κ B mRNA相对表达量均高于空白组($P<0.05$);苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻黏膜TLR4 mRNA、MyD88 mRNA及NF- κ B mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.05$);苍耳温胆汤组大鼠鼻黏膜TLR4 mRNA、MyD88 mRNA及NF- κ B mRNA相对表达量均低于西替利嗪组($P<0.05$)。(见表5、图2)

3.5 各组大鼠鼻黏膜TLR4、MyD88及NF- κ B蛋白相对表达量比较 模型组、苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻黏膜TLR4、MyD88及NF- κ B蛋白相对表达量均高于空白组($P<0.05$);苍耳温胆汤组、西替利嗪组大鼠鼻黏膜TLR4、MyD88及NF- κ B蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$);苍耳温胆汤组大鼠

鼻黏膜TLR4、MyD88及NF-κB蛋白相对表达量低于西替利嗪组($P<0.05$)。(见图3、表6)

表5 各组大鼠鼻黏膜 TLR4 mRNA、MyD88 mRNA 及NF-κB mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TLR4 mRNA	MyD88 mRNA	NF-κB mRNA
空白组	10	0.53 ± 0.03	2.56 ± 0.42	0.32 ± 0.02
模型组	10	1.95 ± 0.18 ^a	16.87 ± 1.70 ^a	1.01 ± 0.09 ^a
西替利嗪组	10	1.05 ± 0.05 ^b	8.15 ± 2.12 ^b	0.50 ± 0.03 ^b
苍耳温胆汤组	10	0.59 ± 0.05 ^{bc}	4.15 ± 0.72 ^{bc}	0.35 ± 0.03 ^{bc}
F		614.799	464.119	384.455
P		0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与西替利嗪组比较,^c $P<0.05$ 。

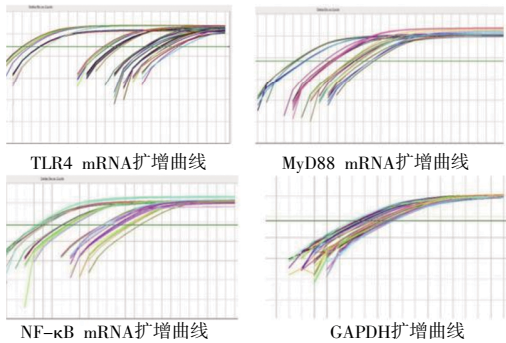


图2 扩增曲线

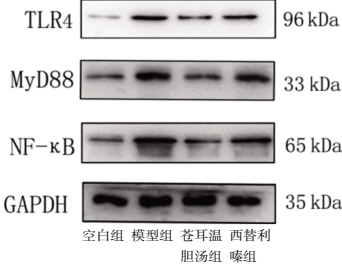


图3 各组大鼠鼻黏膜 TLR4、MyD88 及 NF-κB 蛋白表达 Western blotting 图

表6 各组大鼠鼻黏膜 TLR4、MyD88 及 NF-κB 蛋白 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TLR4	MyD88	NF-κB
空白组	10	0.02 ± 0.00	0.17 ± 0.02	0.25 ± 0.04
模型组	10	0.33 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.09 ^a	0.99 ± 0.15 ^a
西替利嗪组	10	0.18 ± 0.00 ^{bc}	0.50 ± 0.03 ^{bc}	0.62 ± 0.06 ^{bc}
苍耳温胆汤组	10	0.08 ± 0.01 ^{ab}	0.32 ± 0.07 ^{ab}	0.28 ± 0.04 ^{abc}
F		948.392	95.110	128.970
P		0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与西替利嗪组比较,^c $P<0.05$ 。

4 讨 论

AR作为儿童主要的呼吸道炎症性疾病,受遗传、过敏原、环境等多种因素共同影响。AR发病后主要表现为鼻黏膜水肿、鼻部分泌功能亢进等症状。此病病程较长、迁延难愈,并与腺样体肥大、哮喘、睡眠功能障碍等多种疾病密切相关,严重影响患儿正常的学习生活及身心健康^[13]。

AR按其症状可以归属于中医“鼻鼽”“鼻嚏”等范畴。王有鹏教授认为此类变态反应性疾病的形成与寒地儿童湿热体质密切相关,改善寒地儿童湿热体质是治疗儿童过敏性疾病的关键^[14]。故治疗此病应以“分消走泄”为治则,一方面开上、畅中、渗下从不同部位给邪以出路,另一方面应用行气之品宣畅气机,使气行则湿去病自除。在此理论基础上,王有鹏教授结合多年临床经验,推崇仲景“合方理论”,遵从国医大师张琪教授“合方治病”的思想,临床常应用温胆汤治疗儿童湿热性疾病^[15]。同时王有鹏教授根据儿童AR的病、证、体,创制了苍耳温胆汤。该方由苍耳子散与温胆汤合方加减化裁而成。方中温胆汤分消上下之势,通利三焦治疗湿邪困肺脾,阻遏气机;茯苓芳香化湿,健脾和中,能清热利湿而不损伤正气;苍耳子具有上通脑顶,外达皮肤的特点,能通窍散风祛湿。两药共用,外散风邪,内清湿热,共奏内外同治之功。半夏燥湿止呕,和中降逆;竹茹甘淡微寒,降逆清热痰,尤善清上焦之热;辛夷辛温通窍,祛风邪,增强苍耳子疏散风热、通利鼻窍之功。陈皮化痰行气宽中;枳实清下焦湿热,使邪气从下焦“走泄”;白芷、薄荷解表。四药物合用,共奏“以通为补,以辛散邪”之功^[16]。苍耳子散宣通鼻窍,温胆汤清利湿热。两方合用标本兼治,使湿去而热不独存,热去而湿无所依,内外合治,从而改善寒地儿童湿热体质。研究^[17]表明,苍耳温胆汤治疗儿童AR临床疗效显著,且无明显副作用。

血清IgE水平与AR的症状严重程度有密切的关系^[1],同时血清白细胞介素水平也与AR存在密切关联。IL-6及IL-10是由白细胞产生的细胞因子,可介导白细胞之间相互作用^[17]。白细胞介素能够激活与调节免疫细胞,介导T淋巴细胞、B淋巴细胞活化、增殖与分化,在炎症反应中起重要作用^[18]。IL-6为促炎因子,可引起鼻黏膜炎症反应;IL-10是由TLR受体分泌的抗炎因子,可抑制炎症细胞因子合成^[19]。本研究结果表明,苍耳温胆汤组大鼠血清IL-6及IgE水平低于模型组($P<0.05$),IL-10水平高于模型组($P<0.05$)。表明苍耳温胆汤能降低IgE及炎症因子IL-6水平,提高抗炎因子IL-10水平,减轻鼻黏膜的炎症反应。

TLR4的作用机制也是近年研究学者的关注热点^[20]。TLR4/MyD88/NF-κB信号通路是调控机体炎症反应的重要通路之一^[21-23]。AR的发病与炎症反应关系密切。TLR4可通过识别致病抗原后结合相关的信号分子,诱导机体产生相应的免疫应答反应,分泌与AR发病相关的炎症因子^[24]。MyD88是TLR4/MyD88/NF-κB信号通路的衔接蛋白。在机体受到病原体侵袭时,TLR4与MyD88蛋白结合,并激活下游的信号分子。NF-κB是一种转录因子,可参与相关免疫转导过程,协助炎症因子聚集在鼻黏膜的上皮细胞,诱发鼻黏膜炎症^[25]。TLR4/NF-κB通路异常激活会破坏免疫稳态,从而导致多种免疫性疾病^[26-27]。NF-κBp65活化能提高Th2细胞因子中IL-4、IL-6和TNF-α水平,降低Th1因子IL-10和IFN-γ水平,引起Th1/Th2细胞因子失衡,从而导致AR^[28]。本研究结果显示,苍耳温胆汤组大鼠鼻黏膜炎症细胞浸润减少,组织形态学结构正常;苍耳温胆汤组大鼠鼻炎症状测定评分低于模型组($P<0.05$),鼻黏膜TLR4、MyD88、NF-κB蛋白相对表达量及TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF-κB mRNA相对表达量均低于模型组($P<$

0.05)。表明苍耳温胆汤能下调TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路表达,减少炎症因子的释放,减轻AR症状。

综上所述,苍耳温胆汤可能通过下调TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白及TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、NF- κ B mRNA表达,从而抑制鼻黏膜炎症反应,治疗AR。鉴于信号传导通路的复杂性,本研究尚存在一些局限,未来需进一步探究苍耳温胆汤中具体有效成分及其更详尽的作用机制。

参考文献

- [1] 刘畅,屈静,陈陆泉,等.益气宣化法调节变应性鼻炎小鼠血清IGE及鼻黏膜IL-10表达机制研究[J].中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2024,32(5):321-324.
- [2] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组,中华医学学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组、小儿学组.儿童变应性鼻炎诊断和治疗指南(2022年,修订版)[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2022,57(4):392-404.
- [3] FARROKHI S, ABBASIRAD N, MOVAHED A, et al. TLR9-based immunotherapy for the treatment of allergic diseases[J]. Immunotherapy, 2017, 9(4):339-346.
- [4] 徐赫彤,钟水军,刘静,等.西替利嗪联合糠酸莫米松对过敏性鼻炎患儿LEOS水平和LTE4浓度的影响[J].中国妇幼保健,2024,39(11):2010-2013.
- [5] 单佳铃,程虹毓,文乐,等.TLR/MyD 88/NF- κ B信号通路参与不同疾病作用机制研究进展[J].中国药理学通报,2019, 35(4):451-455.
- [6] CHEN S N, TAN Y, XIAO X C, et al. Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(10):1610-1619.
- [7] 齐丹,李天星,郑洁,等.儿童过敏性鼻炎中医外治法研究进展[J].中国民间疗法,2024,32(9):107-110.
- [8] 郭峥,侯一鸣,刘璐佳,等.分消走泄法在南北地域差异下的儿科临床运用[J].时珍国医国药,2021,32(7):1712-1713.
- [9] 杨巍.苍耳温胆汤治疗儿童变应性鼻炎(湿热蕴脾证)的临床观察[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020.
- [10] 董培良,殷鑫,张天宇,等.不同致敏原诱发过敏性鼻炎模型比较[J].中国药师,2014,17(2):196-198.
- [11] 张华,赵娟,雍军,等.实验性变应性鼻炎鼠类模型的建立[J].新疆医科大学学报,2006,29(1):56-57.
- [12] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9):1069-1072.
- [13] 孙银萍,章龙飞,肖小玉,等.穴位贴敷治疗儿童变应性鼻炎的疗效观察及对免疫球蛋白和炎症因子水平的影响[J].上海针灸杂志,2024,43(4):451-455.
- [14] 史梦迪,杨阳,司秀影,等.基于分消走泄法调节湿热体质治疗儿童变态反应性疾病[J].西部中医药,2024,37(4): 37-41.
- [15] 司秀影,黄程程,刘璐佳,等.基于“三焦气化”理论运用分消走泄法治疗小儿湿疹[J].西部中医药,2024,37(7):18-21.
- [16] 徐新,刘畅,曹佳渊,等.加减苍耳子散通过调控Syk/PI3K/AKT信号通路治疗变应性鼻炎的效果与作用机制[J/OL]. 中药药理与临床, 1-25[2024-10-20].https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20241016.001.
- [17] 刘静,刘钢,吴飞虎.“调神通窍针法”治疗变应性鼻炎的临床观察及对血清中IL-6、IL-10水平的影响[J].中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2021,29(2):101-105.
- [18] 孔凡盛,周围,庄晟坚,等.针刺、穴位埋线联合治疗过敏性鼻炎疗效及对炎症因子IL-4、IL-6、IL-10的影响[J].中华中医药学刊,2024,42(9):140-143.
- [19] STANIC B, VAN DE VEEN W, WIRZ O F, et al. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(3): 771-780.e8.
- [20] 谢勇,余志强,李容华,等.H3K27乙酰化修饰促进lncRNA OIP5-AS1转录并通过上调TLR4诱导过敏性鼻炎鼻黏膜上皮细胞凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2024,40(5): 419-427.
- [21] 许楠,赵雁焕,杨春山.基于TLR4通路探讨自拟清热凉血方对牙周炎大鼠的抑炎作用及对牙周组织生长的影响[J].中医药导报,2021,27(7):32-36.
- [22] 赵珊珊,王佳娣,刘颖,等.基于TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路研究清眩明目饮对苯扎氯铵诱导的干眼大鼠的作用机制[J].中医药导报,2024,30(8):27-33.
- [23] 朱博超,李彦杰,秦合伟,等.针刺通过TLR4/NF- κ B信号通路调控炎症反应治疗中枢神经系统疾病的作用机制研究进展[J].中医药导报,2023,29(2):160-165.
- [24] KOKKINOPOULOS I, JORDAN W J, RITTER M A. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes[J]. Mol Immunol, 2005, 42 (8):957-968.
- [25] 胡青,颜微微,王文广,等.黄芩素通过抑制NF- κ B/STAT3/ERK信号通路改善过敏性鼻炎小鼠的炎症反应[J].中国老年学杂志,2024,44(1):165-170.
- [26] LIU P Q, QIN D X, LV H, et al. Activation of dopamine D2 receptor alleviates neuroinflammation in a mouse model of allergic rhinitis with olfactory dysfunction[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2021, 13(6):882-895.
- [27] YAO Q, LIN D M, YANG Y Y, et al. Combination of doxycycline with metronidazole protects against pyroptosis in rats with endometritis through the modulation of TLR4/NF- κ B pathway[J]. Discov Med, 2024, 36(180): 140-149.
- [28] 陆智芸,许水森,农应全.重组人干扰素 γ 对变应性鼻炎大鼠Toll样受体4/核因子- β 信号通路及血清炎症因子的影响[J].安徽医药,2021,25(11):2126-2130.

(收稿日期:2024-10-23 编辑:蒋凯彪)